



ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЪ-ФАРАБИ AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

ХАБАРШЫ

ЭКОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ

ВЕСТНИК

СЕРИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ

BULLETIN

ECOLOGY SERIES

4(36) 2012

ISSN: 575.224.23:599.323:612.64

А.В. Ловинская^{1*}, С.Ж. Колумбасва^{1,2}, Д.А. Бегимбетова¹, А.М. Калимагамбетов^{1,2}¹НИИ проблем экологии, Казахстан, г. Алматы²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: annalovinska@rambler.ru

Изучение органоспецифичности генотоксического действия фипронила методом щелочного гель-электрофореза

Аннотация. В статье рассматривается применение метода гель-электрофореза изолированных клеток для изучения органоспецифичности генотоксического действия фипронила на висцеральных органах мышей (легкие, селезенка, печень). Установлено, что фипронил при всех сроках и дозах воздействия на лабораторных животных оказывал выраженный генотоксический эффект, проявившийся в статистически значимом увеличении содержания процента ДНК в «хвосте кометы». В клетках всех изучаемых органов интоксцированных животных выявлены однонитевые разрывы ДНК. Наиболее чувствительными к генотоксическому действию фипронила висцеральными органами выявились селезенка и печень.

Ключевые слова: фипронил, фенилпиразол, инсектицид, генотоксичность, органоспецифичность, индекс повреждения, однонитевые разрывы ДНК, щелочной гель-электрофорез.

В последнее время в Казахстане для борьбы с каранционными используют новый инсектицид адолас, относящийся к классу фенилпиразолов, и основным действующим веществом которого является фипронил [1, 2]. Несмотря на эффективность применения данного инсектицида, он обладает рядом отрицательных характеристик. Так, он химически устойчив в окружающей среде и способен накапливаться в почве, воде, растениях и животных. К наиболее распространенным его метаболитам относятся фипронил-сульфон (МБ 46136), фипронил-сульфид (МБ 45950), фипронил-дисульфид (МБ 46513) [3, 4]. По классификации ВОЗ фипронил относится к II классу токсичности – умеренно опасный пестицид [4]. В литературе имеются противоречивые сведения о генотоксичности фипронила. В клетках легких китайского хомячка *in vitro* обнаружено достоверное увеличение частоты хромосомных aberrаций при добавлении в культуральную среду фипронила [5]. Фипронил не вызывал мутации в лимфоцитах человека, в клетках китайского хомячка V79, *Salmonella* (Тест Эймса), микронуклеусах мыши [4].

Метод гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет, «DNA-comet assay»), впервые описанный Ostling O. и Johansson KJ.

в 1984 г., является быстрым и весьма чувствительным методом регистрации повреждений ДНК и изучения репарации ДНК на уровне одиночных клеток. Использование щелочного варианта метода ДНК-комет позволяет оценивать, главным образом выход однонитевых разрывов и щелочлабильных сайтов [6].

Материалы и методы исследований

В эксперименте было использовано 25 мышесамцов линии *BALB/cYwal* в возрасте 2 месяцев, разделенных на 5 групп по 5 животных в каждой: I – интактные животные (контроль); II–III – животные с 6-часовой экспозицией фипронила в дозах 31,7 мг/кг (1/3ЛД₅₀) и 19 мг/кг (1/5ЛД₅₀), соответственно; IV–V – животные с 24-часовой экспозицией фипронила в дозах 31,7 мг/кг (1/3ЛД₅₀) и 19 мг/кг (1/5ЛД₅₀), соответственно. Дозировка была выбрана исходя из имеющихся сведений о ЛД₅₀ фипронила [7]. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Для исследования использовали следующие органы: печень, лёгкие, селезенка.

Степень повреждения ДНК клеток этих органов изучали в соответствии с рекомендациями [8].

Клетки иммобилизовали в 0,5% теплой (37°C) легкоплавкой агарозе. Полученную взвесь клеток наносили на подготовленный слайд (1% нормоплавкая агароза на воде), затем клетки лизировали в течение 1 час при 4°C (2,5 mM NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, с добавлением непосредственно в день эксперимента 10% DMSO и 1% Triton-x100 (в% от конечного объема), pH10). После лизиса, слайды помещали в щелочной буфер (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH13) на 20 минут для раскручивания спирали ДНК и реализации щелочелабильных сайтов в одностранные разрывы.

После этого последовательно проводили: электрофорез (1 В/см, 300мА, 20 мин.), нейтрализацию и фиксацию в 70% этиловом спирте, высушивание их при комнатной температуре и окраска акридиновым оранжевым.

Проводили флуоресцентный анализ препаратов с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axio Imager D1 (Carl Zeiss, Германия). На каждый препарат рандомизированно анализировали не менее 100 «ДНК-комет», которые фотографировали и подсчитывали процент ДНК в «хвосте «кометы»» с помощью программы TriTek CometScore™. Показатель «% ДНК в хвосте кометы» отражает количество низкомолекулярной ДНК в виде одностранных фрагментов, образовавшихся в результате разрывов и реализации щелочелабильных участков ДНК, и мигрировавших в сторону анода при электрофорезе.

Показателем выраженного генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), который вычисляется по формуле:

$$ИП = \frac{D_o}{D_k}$$

где D_o – «% ДНК в хвосте» в опытной группе.

D_k – «% ДНК в хвосте» в контрольной группе.

Индекс повреждения, превышающий 2,0, указывает на то, что исследуемый образец обладает выраженными генотоксическими свойствами.

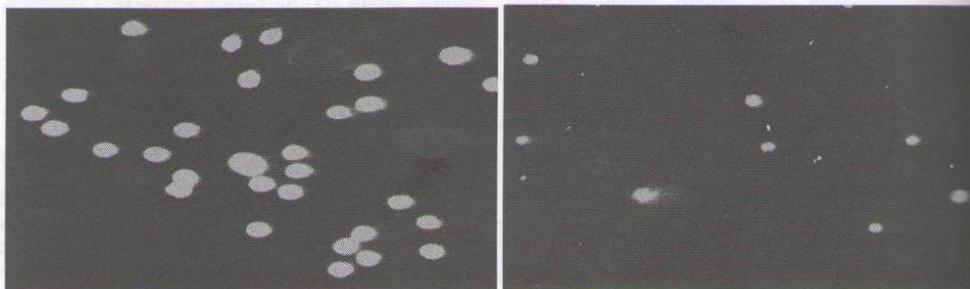
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Win Stat – приложения для Excel. Уровень значимости определяли по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты исследований и обсуждение

В ходе исследования было установлено, что при различных дозах и сроках воздействия фипронила увеличивается процентное содержание ДНК в хвосте «кометы» во всех исследуемых органах.

С увеличением как дозы, так и времени воздействия ксенобиотика увеличиваются разрывы ДНК в клетках всех изучаемых органов. При этом в клетках легких и селезенки разрывы ДНК происходят в первые шесть часов воздействия, а к 24 часам они снижаются. В клетках печени наблюдается противоположная картина, то есть к 24 часам идет увеличение разрывов ДНК.

В качестве типичной картины, наблюдаемой при гель-электрофорезе клеток с поврежденной ДНК, на рисунке 1 приведена фотография части слайда с клетками печени мышей, обработанных фипронилем.



а – интактные животные

б – при 24-часовом воздействии 31,7 мг/кг фипронила

Рисунок 1 – «Кометы» клеток печени мышей при воздействия фипронила

При введении фипронила в дозе 31,7 мг/кг ДНК в «хвосте кометы» клеток легких составило $5,45 \pm 0,11$ и $3,56 \pm 0,13$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно. А при введении

19,0 мг/кг ксенобиотика – в $3,03 \pm 0,14$ и $2,53 \pm 0,09$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно. При этом в контроле процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» составляло $1,66 \pm 0,07$ (рисунок 2).

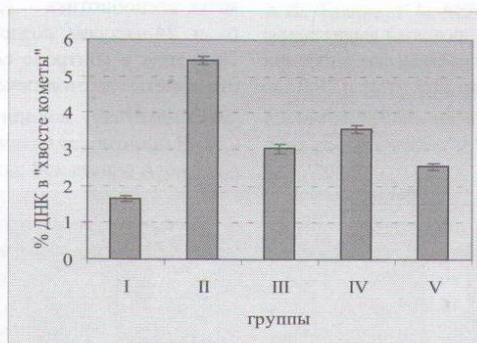


Рисунок 2 – Процентное содержание ДНК в хвосте «кометы» в клетках легких при различных дозах и времени воздействия фипронила

Сравнительный анализ процента ДНК в «хвосте кометы» в клетках легких интактных и интоксцированных животных выявил статистически значимое изменение этого показателя у последних ($P < 0,001$). В течение времени наблюдается статистически значимое изменение этого показателя между II и III, II и IV, III и IV ($P < 0,001$) экспериментальными группами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фипронил проявляет выраженные генотоксические свойства в клетках легких при 31,7

мг/кг при 6- и 24-часовом воздействии (индекс повреждения – 3,3 и 2,1, соответственно).

При введении 31,7 мг/кг фипронила процент ДНК в «хвосте кометы» клеток селезенки составил $3,44 \pm 0,15$ и $2,94 \pm 0,07$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно, а при введении 19,0 мг/кг ксенобиотика – $3,34 \pm 0,14$ и $2,07 \pm 0,09$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно. При этом в контроле процентное содержание ДНК в «хвосте кометы» клеток селезенки составляло $1,57 \pm 0,06$ (рисунок 3).

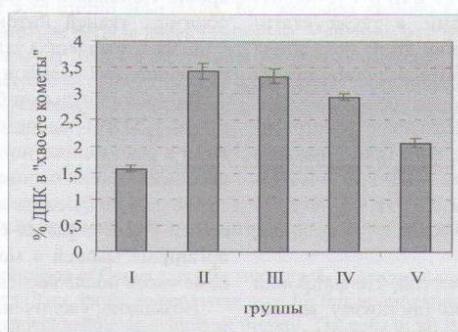


Рисунок 3 – Процентное содержание ДНК в хвосте «кометы» в клетках селезенки при различных дозах и времени воздействия фипронила

Сравнительный анализ процента ДНК в «хвосте кометы» селезенки выявил статистически значимое увеличение этого показателя между интактными и интоксцированными животными ($P < 0.001$), а также статистически значимое уменьшение этого показателя между IV и V ($P < 0.001$) экспериментальными группами.

Следовательно, фипронил проявляет выраженные генотоксические свойства и в клетках селезенки при 6-часовом воздействии в дозах 31,7 мг/кг и 19,0 мг/кг (индекс повреждения – 2,2 и 2,1, соответственно).

В клетках печени, наоборот, процент повреждения ДНК зависел от времени воздействия. При введении 31,7 мг/кг фипронила процент ДНК в «хвосте кометы» клеток печени составил $3,70 \pm 0,09$ и $5,64 \pm 0,13$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно. При введении 19,0 мг/кг ксенобиотика – $2,74 \pm 0,07$ и $3,70 \pm 0,09$ при 6- и 24-часовом воздействии, соответственно. При этом в контроле содержание ДНК в «хвосте кометы» клеток печени составило 1,70% (рисунок 4).

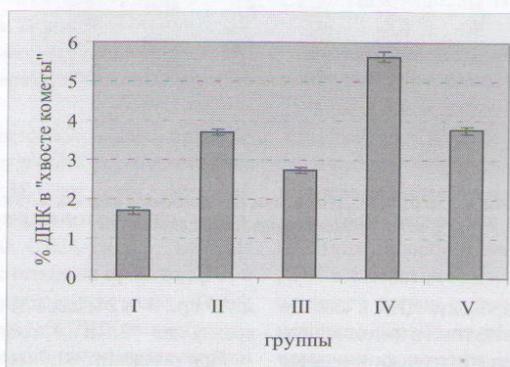


Рисунок 4 – Процентное содержание ДНК в хвосте «кометы» в клетках печени при различных дозах и времени воздействия фипронила

Сравнительный анализ процента ДНК в «хвосте кометы» клеток печени выявил статистически значимое увеличение этого показателя между интактными и интоксцированными животными ($P < 0.001$), а также между II и IV и III и V ($P < 0.001$) экспериментальными группами, а также статистически значимое уменьшение этого показателя между II и III, IV и V ($P < 0.001$) экспериментальными группами.

Фипронил проявляет выраженные генотоксические свойства в клетках печени при 6-часовом воздействии в дозе 31,7 мг/кг (ИП=2,2) и 24-часовом воздействии в дозах 31,7 мг/кг и 19,0 мг/кг данного вещества (индекс повреждения – 3,3 и 2,2, соответственно).

Из данных литературы известно, что фипронил широко распространяется по организму млекопитающих. Крысы, подвергшиеся острому воздействию, имели самую большую концентрацию фипронила в желудке, желудочно-кишечном трак-

те, жире, надпочечниках. Умеренные количества обнаружены в печени, поджелудочной и надпочечных железах, яичниках. Низкие уровни присутствовали в мышцах, мозге, сердце и почках крови. Основным метаболитом, обнаруженным в образцах тканей интоксцированных животных, был фипронил-сульфон [4].

Фипронил-сульфон быстро образует метаболитом NADPH-зависимого окисления цитохрома P450 в рекомбинантной системе CYP2C9 в микросомах печени человека *in vitro*. Метаболитом также найден в печени мышей совместно с фипронилем [9]. Фипронил-сульфон обнаруживался в организме мышей в мозге, печени, почках через семь часов после введения фипронила [10].

Возможно, увеличение нарушений ДНК в клетках печени от времени воздействия связано с метаболизмом фипронила, который в печени метаболизируется в фипронил-сульфон, обнаружива-

выраженным гепатотоксическим эффектом. Исследования с помощью метода Comet assay свидетельствуют о генотоксическом действии фипронила на органы мышей (печень, легкие, селезенка) в зависимости от дозы и времени действия.

Литература

- Справочник пестицидов (ядохимикатов), предназначенных к применению на территории Республики Казахстан. – Алматы: Рекламное Агентство «АТ» А.А., 2010. – 164 с.
- Сагитов А.О., Ысак С., Евдокимов Н.Я. Изучение объемов химических обработок сельскохозяйственных культур в Казахстане // Защита растений. – 2002. – №1. – С. 19-20.
- Insecticide Factsheet. Fipronil // Journal Of Pesticide Reform – 2005 – Spring – Vol. 25, – No. 1.
- Fipronil technical fact sheet // National Pesticide Information Centre. – 2009. – January. – 11 p.
- Wright N.P. Fipronil: Chromosomal aberration test in CHL cells *in vitro*. // Unpublished report No. 282/456 from Safepharm Laboratories Ltd. 1999. Submitted to WHO by Rhone-Poulenc, Inc., Research Triangle Park, NC, USA
- 6 Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки поврежденной ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. – Т. 10. – № 3. – 2008. – С. 303-309.
- 7 Белан С.Р. *Новые пестициды* / С.Р. Белан, А.Ф. Трапов, Г.М. Мельникова: Справочник. – М., 2001. – 196 с.
- 8 «Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений» // Методические рекомендации: М. – 2006.
- 9 Xilong Zhao, Jay Z. Yeh, Vincent L. Salgado, and Toshio Narahashi. Sulfone Metabolite of Fipronil Blocks γ -Aminobutyric Acid- and Glutamate-Activated Chloride Channels in Mammalian and Insect Neurons // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2005. – v. 314, № 1. – P. 363-373.
- 10 Fipronil *chemicalWATCH* Factsheet – <http://www.beyondpesticides.org/pesticides/factsheets/Fipronil.pdf>.
- 11 Бегимбетова Д.А., Колумбаева С.Ж., Шалахметова Т.М. Гистологическое исследование висцеральных органов крыс разного возраста, интоксцированных фипронил-сульфоном // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2008. – № 4 (39). – С. 75-79.

А.В. Ловинская, С.Ж. Колумбаева, Д.А. Бегимбетова, А.М. Калимагамбетов

Исследование влияния фипронил-сульфоном на висцеральные органы крыс с помощью метода щелочного гель-электрофореза эдиси аркылы фипронилдің генотоксиндік әсерінің мүшелік өзгешелігін зерттеу

Мәқалда тышқанның висцералды мүшелеріне (өкпеге, көкбауырға, бауырға) фипронилдің генотоксиндік әсерінің мүшелік өзгешелігін зерттеуде жекеленген клеткалардың щелочного гель-электрофорез әдісін қолдануы зерттелген. Фипронилдің лабораториялық жануарларға барлық мерзімінде және дозаларының әсерінің статистикалық маңызды ретінде көбеюі байқалды. Уландырылған жануарлардың зерттеуге алынған мүшелерінің клеткаларында ДНК-ың бір тізбекті үзілістері анықталды. Висцералды мүшелердің ішінде фипронилдің генотоксиндік әсеріне ең сезгіш көкбауыр және бауыр болып табылды.

Түйін сөздер: фипронил, фенилпиразол, инсектицид, генотоксинділік, мүшелік өзгешелік, бұзылу индексі, тізбекті үзілістері, сілтілік щелочного электрофорез.

A.V. Lovinska, S.Zh. Kolumbaeva, D.A. Begimbetova, A.M. Kalimagambetov

The study of organospecificity of fipronil's genotoxic effect by comet assay

The article represents the application of Comet assay for studying the organospecificity of fipronil's genotoxic effect. Cells from three mice organs (liver, lungs, spleen) were used for this investigation. The statistical analysis revealed dose-dependent and time-dependent genotoxic activity of fipronil. The cells of all study of poisoned animals revealed single-strand DNA breaks. The spleen and liver are most sensitive to the genotoxic effects of fipronil.

Keywords: fipronil, phenylpyrazole, insecticide, genotoxicity, organospecificity, damage index, single-strand DNA breaks, alkaline comet assay.